取 扱 説 明 書

ヒト骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)
Human Marrow Stromal Cells (HMSC)
(Code No. CA49205f)

このたびは、ヒト骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)をお買い上げ頂き有り難うございます。
皆様の研究に有効にお使い頂くために、本取扱説明書を、ご使用前に必ずお読み下さい。

＜ご注意＞
本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断用への使用はできません。

1. 本細胞について

ヒト骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)は健常人の新鮮な骨髄より分離された細胞です。近年の研究から間葉系幹細胞は脂肪・軟骨・骨などに分化することが知られています。本細胞は細胞分化の研究や毒性、遺伝子導入、薬剤スクリーニングの研究などに利用できます。本細胞は2継代目の細胞を凍結状態で出荷いたしております。本細胞は弊社間葉系幹細胞増殖培地・MF-medium®をご使用頂くことで、優れた増殖性を示します。本製品は HBV、HCV、HIV についてはウイルス検査を行い、混入否定を確認しておりますが、ヒト由来ですので細胞の取り扱いには十分にご注意下さい。

2. 製品内容

ヒト骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)(HMSC)　凍結バイアル　1本　($5x10^5$cells)

【関連商品のご紹介】

品名及び内容	包装	Code No.
間葉系幹細胞増殖培地 (基礎培地, 添加剤)　MF-medium®	500ml	TMMFM-001
サブカルチャー試薬セット (ﾊﾝｸｽ平衡緩衝塩溶液、ﾄﾘﾌﾟｼﾝ-EDTA 溶液、ﾄﾘﾌﾟｼﾝ中和液)	1set	CA090K
脂肪細胞分化培地 (基本培地, 添加剤)	250ml	CA811D250
骨芽細胞分化培地 (基本培地, 添加剤)	250ml	CA417D250

3. 製品の受入と保存

細胞は凍結状態(−80℃)で、5x10^{5}cell/ﾊﾞｲｱﾙを1本出荷しております。到着後すぐご使用になられない場合は、直ちに液体窒素中に保存してください。異常がある場合には東洋紡(株)ライフサイエンス事業部(大阪:06−6348−3786、東京:03−6422−4819)までご連絡下さい。

4. 細胞の溶解

① 溶解した細胞を懸濁させるための培地(約10ml)を15ml遠心チューブに分注し、氷冷しておく。

② バイアル1本を取り出し、37℃恒温槽で急速に溶解する。

(注)このとき、液体窒素が噴出することがあるので、必ず保護具を着用して下さい。

また、コンタミの危険を避ける為、バイアルの蓋を水槽に漬けないようにして下さい。

③ バイアル内に氷塊が少し残る程度になれば、バイアルを氷中に戻す。

(注)細胞生存率が低下する原因になりますので、必要以上の加温は避けて下さい。

④ バイアルに培地を1ml程度徐々に滴下し DMSO を希釈した後、全量を①の浮遊用培地が入った遠心チューブに穏やかに移し、懸濁する。

(注)凍結液には DMSO が入っています。急速に希釈・懸濁すると、細胞生存率が低下する原因になります。

⑤ 浮遊細胞を冷却低速遠心機で4℃、200g、5分間 遠心する。

⑥ 沈殿した細胞を吸わないように注意しながら上清を吸引し、約1mlの培地に再懸濁させる。

⑦ 予め13mlの培地を入れておいた T−75 フラスコに⑥の細胞浮遊液を全量植え込む。

5. 培地交換

培地交換は1日おきに行います。

① 調製した培地を必要量だけ37℃あるいは室温に温める。

② クリーンベンチ内でフラスコから古い培地を吸引除去し、①の培地を入れる。

※ *培地量は、T−25 フラスコ／φ60mmシャーレでは5ml、T−75 フラスコ／φ100mmシャーレでは15mlが適量です。*

6. 細胞の継代培養

細胞が85−95%コンフレントな状態に達したら、下記要領(T−75 フラスコの例)に従い細胞を回収します。

予め、サブカルチャー試薬を4℃の冷蔵庫に移し、一晩置いて解凍し、均質になるよう数回撹拌しておきます。

(トリプシン/EDTA 溶液は4℃で2週間安定です。分割して使用する場合は、最初に解凍した際に必要量ずつ分注し、−20℃で保存してください)

トリプシン処理は、室温で行い、試薬を37℃に保温しないようにしてください。

① クリーンベンチ内にて、細胞を培養しているフラスコから培地を吸引除去する。

② HBSS で、細胞接着面を洗浄する。洗浄後、HBSS は吸引除去する。

③ T−75 フラスコにトリプシン/EDTA 溶液5mlを入れる。直ちに、フラスコを揺らし、トリプシン/EDTA 溶液をフラスコ培養面全体にいきわたらせる。

④ 直ちにトリプシン/EDTA 溶液4mlを除去する。

⑤ フラスコのキャップを閉め、細胞がトリプシン消化される過程を、室温で顕微鏡にて観察する。通常は2～5分程度かかる。フラスコからはがれてきても丸くならない細胞もある。過消化に注意する。

⑥ フラスコの側面、底面を手のひらで叩き、細胞を十分はがす。

⑦ 5mlのトリプシン中和液を加える。直ちに、フラスコを揺らし、トリプシン中和液をフラスコ培養面全面にいきわたらせ、トリプシン反応を停止させる。

⑧ 細胞浮遊液を50ml滅菌遠心チューブに回収する。

⑨ T-75 フラスコに5mlのトリプシン中和液を加えてフラスコ培養面全体を濯ぎ、この液を⑧のチューブに加える。

⑩ 顕微鏡で確認し、20%以上の細胞がフラスコに残っている場合は、②-⑨を繰り返す。

⑪ 冷却低速遠心機にて220g、5分間遠心し、細胞を沈殿させる。

⑫ 細胞を吸わないように注意しながら、上清を吸引除去する。

⑬ 指でチューブ先端を軽くたたき、ペレットをほぐす。

⑭ 増殖培地　2mlを加え、穏やかにピペッティングし、細胞を再浮遊させる。

⑮ 血球計算盤あるいはセルカウンターで細胞数を計測する。このとき、トリパンブルーによる細胞生存率の測定を行うと、より正確な生細胞数を把握することができる。

⑯ 細胞浮遊液を予め用意したフラスコに細胞浮遊液、及び増殖培地を入れる。インキュベーターに入れ、培養を行う。細胞継代後、2時間（細胞の接着が安定するまで）は静置させる。培養は 37℃、5%　CO_2、加湿で行う。

⑰ 1日後、培地の交換を行う。以後、1日おきに培地の交換を行う。

※ *細胞の継代は、2,000～5,000cells/cm^2 の密度で播種するのが目安です。また、培地量は T-25 フラスコ／φ60mmシャーレでは5ml、T-75 フラスコ／φ100mmシャーレでは15mlが適量です。*

ご注意

- **本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断用への使用はできません。**
- **本製品はウイルス検査を行い、混入否定を確認しておりますが、ヒト由来ですので細胞の取扱いには十分にご注意下さい。**
- **本製品によって生じたいかなる事故あるいは損害についても弊社では責任を負いかねます。ご了承の上、ご使用下さい。**

本製品に関して後不明な点、ご質問等ございましたら、Toyoboテクニカルラインまでご連絡下さい。

＜連絡先＞ Tel:06-6348-3888、 Fax:06-6348-3833、 E-mail:tech_osaka@toyobo.jp

---

◆ 製造元:

Cell Applications Inc.(USA)

◆ 輸入販売元:

東洋紡績株式会社

（大阪）ライフサイエンス事業部 〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
Tel:06-6348-3786、 Fax:06-6348-3833

（東京）ライフサイエンス事業部 〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目10 番 2 号
東五反田スクエア
Tel:03-6422-4819、 Fax:03-6422-4951